

Properties and activities of aminopeptidases in normal and mitogen-stimulated human lymphocytes

メタデータ	言語: jpn 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-23 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 河野, 弘明 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/885

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 32号	学位授与年月日	昭和61年 3月26日
氏名	河野弘明		
論文題目	Properties and activities of aminopeptidases in normal and mitogen-stimulated human lymphocytes (正常及びマイトジェン刺激ヒトリンパ球中アミノペプチダーゼの性質と活性について)		

Properties and activities of aminopeptidases in normal and mitogen-stimulated human lymphocytes

(正常及びマイトジェン刺激ヒトリンパ球中アミノペプチダーゼの性質と活性について)

論文の内容の要旨

アミノペプチダーゼ(以下APと略す)は、種々の動物組織や体液中に存在が示され、又いくつかの臓器から分離精製されるなど広範にわたり研究されてきたが、その細胞内機能は不明のままであった。最近リンパ球内のAPが、リンパ球の活性化に重要な役割を担うことを示唆する報告がなされた。そこでリンパ球APの細胞内機能を検討する目的で、ヒト末梢血リンパ球及び種々のマイトジェンで活性化したヒト培養リンパ球を用い、APの性質と活性の変化を検討した。

〔方法〕

細胞内分画実験及びAPの部分精製に用いたヒトリンパ球は血小板輸血後の残存血液より、また培養実験に用いたヒトリンパ球は新鮮静脈血よりそれぞれ得た。リンパ球は比重遠心法で分離した。リンパ球の培養は10%牛胎児血清を加えたRPMI 1640培地を用い、37℃、5%炭酸ガス-95%空気下でおこなった。

〔結果及び考察〕

1) リンパ球APの細胞内分布を蔗糖密度勾配遠心法を用いて検討した。a) AP活性は細胞質分画、軽い顆粒分画及び重い顆粒分画に存在した。b) 軽い顆粒分画の密度はミクロソームの密度と、また重い顆粒分画の密度はリソソームの密度とそれぞれ一致した。

2) ヒト末梢血リンパ球よりAPを部分精製し、その性質を調べた。a) DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーによりリンパ球から三種のAPが分離された。b) この三種のAPは基質特異性、基質に対するKm値、金属イオンによる活性化度、至適pH、電気泳動による易動度等の点でそれぞれ異なった性質を示した。c) クロマトグラフィーで部分精製した三種のAP各々の性質は、細胞質分画、ミクロソーム分画、リソソーム分画に存在するAP各々の性質とそれぞれ類似した。

以上より、ヒトリンパ球には異なった三種のAPが存在し、さらにこの三種のAPはそれぞれ異なった細胞内局在を示すことが明らかとなった。

3) ヒトリンパ球を培養し各種マイトジェン刺激によるAPの活性及び性質の変化を検討した。a) ヒトリンパ球をマイトジェンを加えずに培養した場合、いずれのAP活性の変化も、培養期間を通じて観察されなかった。b) 培養リンパ球をT-cellマイトジェンであるフィトヘマグルチニン(以下PHAと略す)やコンカナバリンAで刺激すると、加えたマイトジェン濃度に依存して細胞質分画AP活性の顕著な上昇が観察された。細胞質分画AP活性は、マイトジェン刺激後24時間以内に上昇が観察され、72時間後に最高値を示し、以後減少した。c) 一方、他のふたつの顆粒分画AP活性は、同様の条件下でも上昇しなかった。

以上より、マイトジェン刺激によって、リンパ球中の細胞質分画に存在するAPの活性が上昇することが示された。

4) マイトジェン刺激による活性化リンパ球中のAPの性質は、末梢血リンパ球及び非刺激培養リンパ球中のAPの性質と変わらなかった。

5) a) 細胞質分画AP活性上昇のPHA濃度に対する依存性は、リンパ球活性化の指標であるDNA合成速度増加のPHA濃度に対する依存性と一致した。b) PHA刺激による細胞質分画AP活性の上昇は、DNA合成を一時的に阻害しても影響されなかった。

以上より、細胞質分画AP活性の上昇は、マイトジェン刺激によるリンパ球活性化によって生じたものであり、リンパ球活性化に伴う細胞体積の増加や分裂による新細胞出現などによって二次的に生じたのではな

いことが示された。

6) T・B-cell マイトジェンであるポークウィードマイトジェンで刺激すると、培養リンパ球は十分に活性化されるにもかかわらず有意なAP活性の上昇は観察されなかった。

以上より、AP活性の上昇は、リンパ球の機能と関連したものである可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

アミノペプチダーゼ(以下APと略す)は、ペプチド鎖のN末端から順次アミノ酸を遊離するエキソペプチダーゼであり、アミノ酸アミドを基質とするアミダーゼ活性、アリアルアミド(多くの場面人工基質)を水解するエステラーゼ活性も持つ。サイトゾルのロイシンアミノペプチダーゼ(以下LAPと略、EC 3, 4, 11, 1)、ミクロゾームのアリアルアミダーゼ(EC 3, 4, 11, 2)ほか10種類にも及ぶAPが報告されており、これらAPの基質特異性やその他の性質が多かれ少なかれ交錯していること、およびAPが種々の動物組織や体液中に存在することから、臨床検査で血漿中AP活性の上昇を検出しても、それがどの組織のどのAPに由来するかの判別は必ずしも容易でない。APの細胞内機能もまだ実験的に明らかにされたとはいえない。

最近AP阻害剤のベスタチンによるリンパ球細胞分裂の誘起が見出されたこと等から、リンパ球のAPがリンパ球の活性化に何らかの形で関与していることが示唆された。そこで申請者は、リンパ球活性化条件下でのリンパ球APの研究からAPの細胞内機能についての示唆が得られるのではないかという考えに立ち、ヒト末梢血リンパ球APの特性及び種々のマイトジェンで活性化した時のリンパ球AP活性の変動についての研究を行った。

(1) ヒト末梢血リンパ球のAP。血小板輸血後の残存血液より、シリカ粒子を貪食せしめた食細胞を遠心にて除いた上層の白血球層として部分精製し、更にFicollで分画したリンパ球を用い、L-ロイシンアミド(以下LAと略)とL-ロイシン-p-ニトロアニリド(以下L-pNAと略)に対する水解活性をAPの指標として実験が行われた。まず、ショ糖密度勾配遠心法によりAPの細胞内分布を調べたところ、その活性はサイトゾル分画、リソゾーム分画、及びミクロゾーム分画に検出された。一方、AP部分精製のためのDEAEカラムクロマトグラフィーにおいて、リンパ球音波破碎上清液中のAPは、AP-I、AP-II、AP-IIIの3種のAPに分離された。これら各細胞内分画のAP及びDEAEカラムで分離された3種のAPの基質特異性、至適pH、活性に対する金属イオン、特に Mn^{2+} の影響、セルローズアセテート電気泳動における易動度等を調べたところ、ヒトリンパ球は次の3種のAPを含むことが明らかとなった。

	局在細胞内分画	基質特異性(至適pH)		Mn^{2+} の影響	電気泳動における挙動
		LA	L-pNA		
AP-I	リソゾーム	+(8.3)	+(8.3)	↓	移動度極く僅か
AP-II	サイトゾル	+(7.5)	÷	↑	陽極への移動度大 (AP-IIIより小)
AP-III	ミクロゾーム	÷	+(7.5)	↓	陽極への移動度大

(+, 基質とする; ÷, ほとんど基質としない; ↑, 活性化する; ↓, 活性化しない、あるいは逆にやや阻害する)

細胞内局在および酵素の性質からみて、AP-IIはLAPであろうと推定された。

(2) リンパ球の活性化に伴うAP活性の変動。この実験はヒト培養リンパ球を用いて行われた。培養細胞に各種マイトジェンを添加した後、経時的にあるいは72時間後に細胞を集め、凍結融解による破碎上清液中のサイトゾルAP(以下C-APと略)の活性をLAを基質として、同沈渣からの音波破壊抽出液中のミクロゾームAP(以下M-APと略)の活性をL-pNAを基質として測定した。その結果、リンパ球をT-細胞マイトジェンであるフィトヘマグルチニン(以下PHAと略)やコンカナバリンAで刺激すると、加えたマイトジェン濃度に依存してC-APのみの顕著な活性上昇が観察された。このC-APの活性上昇は、リンパ球活性化の1つの指標であるDNA合成速度の増加と同一のPHA濃度に対する依存

性を示したが、ヒドロキシン尿素の添加により一時的にDNA合成を阻害しても影響されなかったことから、マイトジェン刺激によるリンパ球の活性化そのものと関連した現象であり、リンパ球活性化に伴う細胞体積や細胞数の増加によるものではないことが示唆された。一方、T-細胞・B-細胞マイトジェンであるポークワイドマイトジェン(以下PWMと略)ではDNAの合成速度は顕著に促進されたにもかかわらず、有意なC-APの活性上昇は認められなかった。このことは、リンパ球活性化の調節と密接な関係にあるとされている β_2 -ミクログロブリン合成の促進が、PHA刺激では起こるがPWMでは起こらないと報告されていることと関連して興味深いとして議論された。

以上、本研究は、ヒト末梢血リンパ球に性質および細胞内局在の異なる3種類のAPが存在することをはじめて明らかにし、また、そのうちサイトゾルのAP-Ⅱの活性のみがT-細胞マイトジェンによるリンパ球の活性化機構の一翼を担い、重要な役割を果たしていることを示唆した質の高い研究である。本審査委員会では、審査の結果、本研究が医学博士の学位授与にふさわしいものであると、全員一致で判定した。

論文審査担当者 主査 教授 市 山 新
副査 教授 阿 曾 佳 郎 副査 教授 吉 田 孝 人
副査 助教授 金 井 弘 一 副査 助教授 瀧 川 雅 浩